

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2012)06-0370-04

马铃薯 X 病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测

朱云芬, 程 群*, 沈艳芬, 田恒林

(中国南方马铃薯研究中心, 湖北 恩施 445002)

摘 要: 马铃薯 X 病毒(Potato virus X, PVX)是侵染马铃薯重要病毒之一, 通常引起花叶症状, 在田间常与其他病毒混合感染导致马铃薯的毁灭性减产。PVX 尚无有效的药剂可以防治, 加强对 PVX 的快速检测是一个亟待解决的课题。本研究应用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和免疫捕捉反转录聚合酶链式反应(IC-RT-PCR)技术检测马铃薯 X 病毒。结果表明: IC-RT-PCR 方法可检测出稀释至 1.0×10^{-3} 的粗汁液中的病毒; RT-PCR 方法可从稀释至 1.0×10^{-4} 的总 RNA 中扩增出特异的目的条带。这两种方法均具有较高的检测灵敏度, 均可用于马铃薯 X 病毒的检测。

关键词: 马铃薯; X 病毒; RT-PCR; IC-RT-PCR

Detection of Potato virus X by RT-PCR and IC-RT-PCR

ZHU Yunfen, CHENG Qun*, SHEN Yanfen, TIAN Henglin

(Southern Potato Research Center of China, Enshi, Hubei 445002, China)

Abstract: Potato virus X (PVX) is one of the important viruses infecting potato, and usually causes mosaic symptoms. Mixed infection with other viruses in the field often leads to devastation of potato. There is no effective prevention and treatment for PVX, therefore, to strengthen the PVX rapid detection is a subject to be solved urgently. In this research, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocapture reverse transcriptase polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) were used to detect PVX. The results showed that PVX was detected from dilutions equivalent to 1.0×10^{-3} by IC-RT-PCR and from dilutions equivalent total RNA to 1.0×10^{-4} by RT-PCR. The two methods have higher detection sensitivity, and could be used for detecting PVX.

Key Words: potato; virus X; RT-PCR; IC-RT-PCR

收稿日期: 2012-05-28

基金项目: 湖北省农业科技创新中心基金项目(2010NKY028)。

作者简介: 朱云芬(1982-), 女, 助理农艺师, 硕士, 主要从事马铃薯组织培养及病毒检测方面的研究。

* 通信作者(Corresponding author): 程群, 高级农艺师, 主要从事马铃薯组织培养及病毒检测方面的研究, E-mail: enshicq@126.com。

流行主要是由温度、湿度是否适宜与持续时间长短及品种的抗病性而定。一般而言, 中心病株的出现是病害流行的预兆, 也是开始喷药预防马铃薯晚疫病扩大蔓延的适期^[6]。因此, 在晚疫病发生前期喷施保护性杀菌剂是生产中防治马铃薯晚疫病的最佳手段。

在马铃薯生产中, 防治晚疫病农药的施用与否, 经济效益差异明显。因此, 建议生产中尤其是种植早熟品种时, 及时喷施药剂防治晚疫病是提高产量, 获取效益切实可行的措施。

[参 考 文 献]

- [1] 安帝. 马铃薯大垄高产栽培技术[J]. 农民致富之友, 2011(16): 67.
- [2] 周平, 王朝海, 王朝贵, 等. 马铃薯晚疫病发生特点及综合防治技术[J]. 现代农业技术, 2011(1): 210-211.
- [3] 董金皋. 农业植物病理学 [M]. 中国农业出版社, 2001, 136.
- [4] 胡尊艳, 夏平, 李志新, 等. 6 种药剂防治马铃薯晚疫病药效试验[J]. 中国马铃薯, 2010, 24(2): 106-108.
- [5] 金光辉, 文景芝, 丁广州. 我国马铃薯晚疫病的研究现状和建议[J]. 黑龙江农业科学, 2002(6): 28-31.
- [6] 刘永海, 张玉雷. 8 种药剂防治马铃薯晚疫病的效果研究[J]. 农技服务, 2010, 27(5): 594-595.

我国是世界上马铃薯生产第一大国,近年来,我国马铃薯产业发展迅速,马铃薯在我国国民经济增长中占有重要比重,但我国现阶段马铃薯整体生产水平低于世界平均水平^[1],其主要原因之一便是受马铃薯病毒的影响。目前已知的感染马铃薯的病毒有40余种,随国家、地域分布而不同^[2]。马铃薯X病毒(Potato virus X, PVX)是侵染马铃薯重要病毒之一,分布广泛,在世界各马铃薯种植区均有发生。PVX是马铃薯X病毒组的典型成员,是由一条正链RNA组成的线性病毒, RNA分子为 2.1×10^8 Da,长度约为6.4 kb, RNA 3'末端是多聚腺嘌呤核苷酸,5'末端有m7 GppG“帽子”结构^[3]。PVX病毒粒子为长杆状,约515 nm × 13 nm,自然条件下主要靠植株不同部位之间及植株间相互接触摩擦进行机械传播。PVX通常引起花叶症状,某些品种感染轻微或潜伏起来,有的株系可能引起皱缩,某些品种对特定的病毒株系过敏,反应为顶部坏死。据报道,PVX单独侵染马铃薯可降低产量15%左右^[4]。在田间,PVX也可与其他病毒混合侵染,其造成的危害更为严重,导致马铃薯的毁灭性减产。

PVX尚无有效的药剂可以防治,加强对PVX的快速检测是一个亟待解决的课题,脱除病毒和建立无病毒马铃薯快繁体系已成为马铃薯产业健康发展的有效保证,在脱毒马铃薯快繁体系中建立快速、有效的检测方法是重要的环节。本试验利用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和免疫捕捉反转录聚合酶链式反应(IC-RT-PCR)技术两种方法分别对PVX的检测结果进行了比较,旨在建立一套PVX的分子生物学快速检测技术。

1 材料与方法

1.1 试验材料

感染有PVX的马铃薯试管苗由华中农业大学园艺林学院提供。脱毒试管苗‘鄂马铃薯5号’由湖北恩施中国南方马铃薯研究中心提供。

TRIZOL(Invitrogen); M-MLV Reverse Transcriptase, Oligo (dT) primer (Promega); TaqDNA聚合酶, dNTP Mixture, 100 bp DNA ladder, Ribonuclease Inhibitor等购自北京博大泰克公司。

根据GenBank数据库上已公布的PVX的基因序列,设计合成一对PCR引物^[5],为P1:5'-TAG CAC AAC ACA GGC CAC AG-3'; P2:5'-GGC AGC

ATT TCA GCT TC-3',扩增靶带大小为562 bp,引物由上海生物工程公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 RT-PCR 检测 PVX

马铃薯总RNA的提取及检测:采用Invitrogen公司的RNA提取试剂盒,分别取感病植株、脱毒试管苗(对照)约0.1 g液氮迅速研磨,加入1 mL Trizol reagent试剂,按照说明书进行提取。

反转录:以总RNA为模板,加入PCR反应管中,再分别加入Oligo(dT) primer 1 μ L, 0.1% DEPC水10 μ L,混匀离心,用70 $^{\circ}$ C 5 min处理后,置冰上冷却30 s,离心5 s;再依次加入5 \times Reaction Buffer 5 μ L, RNase inhibitor(40 μ g/ μ L)0.5 μ L, dNTPs 1 μ L, M-MLV RT 1 μ L,加0.1% DEPC水至25 μ L,将反应混合物于37 $^{\circ}$ C水浴1 h,70 $^{\circ}$ C灭活10 min,零下20 $^{\circ}$ C保存。

聚合酶链式反应:采用25 μ L反应体系进行,反应混合物包括10 \times buffer 2.5 μ L(含MgCl₂), cDNA 1.5 μ L,引物各0.5 μ L, dNTP 0.5 μ L, Taq酶0.6 μ L, dd H₂O 18.9 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性1 min、60 $^{\circ}$ C复性1 min、72 $^{\circ}$ C延伸1 min,30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min后保存于4 $^{\circ}$ C。扩增结束后,取5 μ L PCR产物于1.0%琼脂糖凝胶进行电泳,并用凝胶成像系统记录结果。

1.2.2 IC-RT-PCR 检测 PVX

包被抗体:将PVX抗血清按1:1 000(v/v)(约5 μ g/mL)的工作浓度用包被缓冲液(Na₂CO₃ 1.59 g; NaHCO₃ 2.93 g; NaN₃ 0.2 g加蒸馏水至1 mL)稀释。混匀后取100 μ L加入灭菌的0.2 mL的薄壁PCR管中。37 $^{\circ}$ C孵育2 h或者4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。

洗管:将上述溶液倒掉并在干净的纸巾上拍打干净后,加200 μ L的洗涤缓冲液(10 mmol/L, pH 7.5的Tris-HCl; 150 mmol/L NaCl; 0.05% Tween-20)静置3 min后倒掉,如此洗涤3次,甩干溶液,置于冰上。

捕捉抗原:取新鲜叶片,按1:5(g/v)的稀释度用提取缓冲液(500 mmol/L, pH 8.2的Tris-HCl; 150 mmol/L NaCl; 2% PVP; 0.05% Tween-20)研磨。4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min离心15 min。取100 μ L上清液加入上述管中,37 $^{\circ}$ C孵育2 h或4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。洗管:同上。

RNA的释放:在上述管中加入20 μ L的释放缓冲液(4 μ L 5 \times RT buffer, 2 μ L 10 mmol/L dNTP, 14 μ L

dd H₂O, 0.2 μL TritonX-100), 在 PCR 仪上 65°C 10 min, 置于冰上。

RT-PCR: 步骤同上。

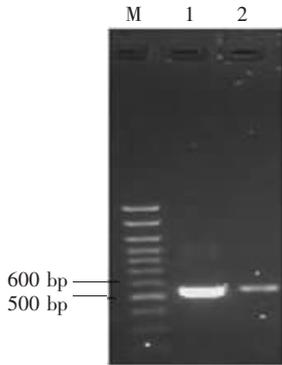
1.2.3 两种方法灵敏度分析

分别对同一感病马铃薯叶片制备粗汁液和提取总 RNA, 分别稀释为 1.0 × 10⁰ - 1.0 × 10⁻⁶, 进行 IC-RT-PCR、RT-PCR 两种检测方法灵敏度比较分析。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 及 IC-RT-PCR 检测马铃薯 X 病毒

本试验结合免疫学和分子生物学检测手段, 分别利用 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 两种方法对感病材料进行了检测。图 1 为电泳检测图, 均扩增出 562 bp 的片段, 与预期目的片段相符, 且 RT-PCR 比 IC-RT-PCR 电泳检测条带亮。



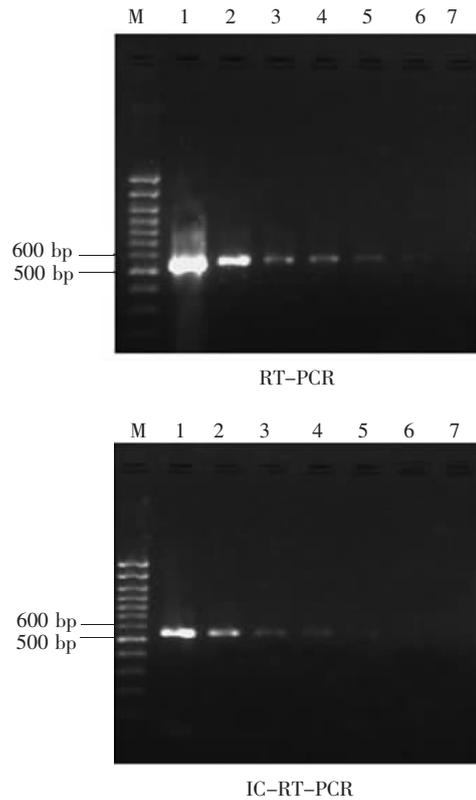
M: 100 bp DNA 分子量标准; 1: RT-PCR 法检测; 2: IC-RT-PCR 法检测。

M: 100 bp DNA Marker; 1: Detection of RT-PCR; 2: Detection of IC-RT-PCR.

图 1 马铃薯 X 病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测
Figure 1 Detection of potato virus X by RT-PCR and IC-RT-PCR

2.2 两种方法灵敏度分析

我们分别对同一感病马铃薯叶片制备粗汁液和提取总 RNA, 分别稀释为 1.0 × 10⁰ - 1.0 × 10⁻⁶ 后, 进行 RT-PCR、IC-RT-PCR 两种检测方法的灵敏度比较试验。结果表明, 用 IC-RT-PCR 方法, 可将检测出稀释至 1.0 × 10⁻³ 的粗汁液中的病毒; 用 RT-PCR 方法, 可从稀释至 1.0 × 10⁻⁴ 的总 RNA 中扩增出约异的的目的条带(图 2)。这表明上述两种方法具有较高的检测灵敏度, 可用于马铃薯病毒检测, 但对于病毒含量比较低的样品的检测, RT-PCR 仍是一种比较好的方法。



M: 100 bp DNA 分子量标准; 1-7: 稀释度分别为 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶。
M: 100 bp DNA Marker; 1-7: Diluted to 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ and 10⁻⁶, respectively.

图 2 两种方法检测马铃薯 X 病毒的灵敏度比较
Figure 2 Two methods for detection of potato virus X

3 讨论

马铃薯是一种分布广泛、适应性强、产量高、营养丰富的宜粮、宜菜、宜饲、宜做工业原料等具有多种用途的经济作物。马铃薯退化的真正原因, 是由于病毒侵染, 并通过块茎无性繁殖逐代增殖和为害的结果。马铃薯病毒的侵染, 导致了马铃薯的品质下降, 同时也导致了马铃薯的产量下降。因此, 建立快速、准确、灵敏的病毒检测方法, 加大对种薯(苗)的检测力度, 从源头上控制种薯(苗)质量, 真正实现脱毒种薯(苗)的全面脱毒, 是阻止病毒侵染、提高产量、发挥优良品种特性的重要手段之一。

马铃薯病毒检测技术主要有传统生物学检测技术、免疫学检测技术、分子生物学检测技术等。传统的生物学鉴定方法尽管检测的结果相当直观

可靠,但是还是具有一些明显的不足,如灵敏度不高,工作量大,难以检测大量的样品;免疫学常用的DAS-ELISA病毒病检测方法是利用血清学原理建立的,虽具有简单、快速的特点,非常适合应用在田间检测,但检测的结果存在着假阳性或假阴性现象,而且只是检测了病毒的外壳蛋白(CP),其遗传信息量只占整个病毒遗传信息量的5%~10%,无法区分因CP基因有一定同源性的病毒类型,且存在不易检测含量极少的韧皮部病毒和不能检测休眠种薯中的病毒等方面的缺陷^[6-8];近年来迅速发展起来的以病毒核酸为对象的分子检测技术,RT-PCR是最常用的一种检测技术,它通过提取总RNA后反转录成cDNA,然后进行扩增,得到目的片段,以其快速、特异和灵敏性高的优点越来越多的应用在马铃薯病毒检测上,但却存在检测费用高,操作要求高,植物组织中其它物质蛋白质、DNA、多糖等的污染,高质量的RNA模板很难获得,这是RT-PCR技术的一个主要的技术瓶颈^[9-12]。

IC-RT-PCR检测技术是免疫学技术与分子生物学技术相结合建立起来的一种新型检测方法,通过捕捉抗原,然后释放出RNA,反转录成cDNA,最后进行扩增,得到目的片段。研究者们将此方法理念应用于植物病毒的检测和基因克隆上^[13-15],Nolasco等^[13]利用IC-RT-PCR技术成功地检测了包括PLRV在内的8种植物病原病毒,1种类病毒和1种卫星病毒,我国的贺鹏飞^[14]采用此技术对PLRV进行了检测研究,方法中的病毒专化抗体可使用依赖于dsRNA的单克隆抗体替代,因此,该技术为不具有病毒专化抗体或采用免疫学技术检测困难的病毒提供了一个可行的检测技术,且与RT-PCR都具有较高的检测灵敏度。本试验将IC-RT-PCR应用到PVX的检查中去,取得了良好的效果,此方法结合了免疫学DAS-ELISA捕捉抗原与分子生物学RT-PCR特异性反转录的特点,不仅不用提取RNA,并在不破坏病毒粒体的情况下即可对病毒进行检测,弥补了RT-PCR检测操作难、结果不稳定的缺点,而且与DAS-ELISA相

比,它更为快速、灵敏、准确,是一种值得推广的PVX病毒检测方法。

[参 考 文 献]

- [1] 魏延安. 世界马铃薯产业发展现状及特点[J]. 世界农业, 2005 (3): 29 - 32.
- [2] Grammatikaki G, Avgelis A, Sonnino A. Behavior of potato gametoclonal plants against the necrotic strain of potato Y potyvirus [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2007, 54(4): 507-512.
- [3] Morozov S Y, Gorbulev V G, Novikov V K, et. al. The primary structure of 5' and 3' terminal regions of potato virus X genomic RNA [J]. Proc Acad Naul SSSR, 1981, 259: 723-725.
- [4] Hooker W J. 马铃薯病害及其防治[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1992: 129-131.
- [5] 王中康, 夏玉先, 袁青, 等. 马铃薯种苗复合感染病毒多重 RT-PCR 同步快速检测[J]. 植物病理学报, 2005, 35(2): 109-115.
- [6] Jelkmann W, Keimkonrad R. Immuno-capture polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for the detection of apple stem pitting virus [J]. Journal of Phytopathology, 1997, 145(11-12): 499-504.
- [7] 白艳菊, 李学湛, 吕典秋, 等. 应用 DAS-ELISA 法同时检测多种马铃薯病毒[J]. 中国马铃薯, 2000, 14(3): 144-145.
- [8] 崔荣昌, 李芝芳, 李晓龙, 等. 应用酶联免疫吸附试验法鉴定几种主要马铃薯病毒[J]. 植物保护学报, 1989, 16(3): 193-197.
- [9] Cieslinska M, Malinowski T, Zawadza B J. Studies on several strains of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) isolated from different fruit tree species[J]. Acta Hort, 1995, 386: 63-69.
- [10] 张彤, 张鹤龄. 用逆转录聚合酶链式反应检测马铃薯卷叶病毒[J]. 病毒学报, 1996, 12(2): 190-192.
- [11] Singh M, Singh R P. Factors affecting detection of PVY in dormant tuber by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization[J]. Journal of Virological Methods, 1996, 60: 47-57.
- [12] Singh R P, Nie X, Singh M. Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2002, 99: 123-131.
- [13] Nolasco G, De Blas C, Torres V, et al. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens [J]. Journal of Virological Mehtodes, 1993, 45(2): 201-218.
- [14] 贺鹏飞. PLRV 的 IC-RT-PCR 和 DAS-ELISA 两种检测方法的比较[D]. 长沙: 湖南农业大学, 1999.
- [15] Maroon Z. PCR-based tests for the detection of tomato viruses and carlaviruses[J]. Acta Horticulturae, 2002, 568: 117-122.